

(19) Japanese Patent Office

(12) Publication of Unexamined Patent Application (A) (11) *Kokai* Number  
**2004-24206**  
**(P2004-24206A)**

(43) Date of Publication: **January 28, 2004**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>		FI	Theme Code (Reference)	
<b>C12N</b>	<b>15/09</b>	C12N 15/00	ZNAA	4B024
<b>C12Q</b>	<b>1/06</b>	C12Q 1/06		4B063
<b>C12Q</b>	<b>1/68</b>	C12Q 1/68	A	
<b>G01N</b>	<b>33/53</b>	G01N 33/53	M	
<b>G01N</b>	<b>33/566</b>	G01N 33/566		
Request for Examination: Not Requested. Number of Claims: 8 OL (25 Pages Total)				
Continued on last page				
(21) Application Number:	2002-189902 (P2002-189902)	(71) Applicant:	591122956 Mitsubishi Chemical Medience Corporation 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo	
(22) Filing Date:	June 28, 2002	(74) Agent:	100089244 Tsutomu Toyama, Attorney	
		(74) Agent:	100090516 Hidemi Matsukura, Attorney	
		(74) Agent:	100100549 Yoshiyuki Kawaguchi, Attorney	
		(72) Inventor:	Hiroaki Ishiko c/o Mitsubishi Chemical Medience Corporation 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo	
		(72) Inventor:	Takashi Yoshida c/o Mitsubishi Chemical Medience Corporation 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku Tokyo	
(continued on last page)				

(54) [Title of the Invention] Method of Detecting Mycoplasma and Ureaplasma

(57) [Abstract]

[Problem] Provide a quick and simple method of detecting mycoplasma genitalium (M. genitalium), mycoplasma hominis (M. hominis), ureaplasma parvum (U. parvum), and ureaplasma urealyticum (U. urealyticum).

[Means for Solving the Problem] Using DNA obtained from the samples as a genetic template, obtain an amplified product by carrying out PCR using primer pairs which can highly amplify the DNA of both mycoplasma and ureaplasma, detect hybrid formation by performing hybridization on the amplified product using a specific nucleic acid probe on M. genitalium, M. hominis, U. parvum, and U. urealyticum, and detect mycoplasma and ureaplasma based on the detection results.

[Selected Drawings] None

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-24206

(P2004-24206A)

(43) 公開日 平成16年1月29日 (2004.1.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

4 B 0 2 4

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/06

4 B 0 6 3

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

M

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-189902 (P2002-189902)

(22) 出願日 平成14年6月28日 (2002.6.28)

(71) 出願人 591122956

株式会社三菱化学ビーシーエル  
東京都板橋区志村3-30-1

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(74) 代理人 100090516

弁理士 松倉 秀実

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(72) 発明者 石古 博昭

東京都板橋区志村3丁目30番1号 株式  
会社三菱化学ビーシーエル内

(72) 発明者 吉田 隆史

東京都板橋区志村3丁目30番1号 株式  
会社三菱化学ビーシーエル内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコプラズマおよびウレアプラズマの検出方法

## (57) 【要約】

【課題】 マイコプラズマ・ジェニタリウム (M. genitalium)、マイコプラズマ・ホミニス (M. hominis)、ウレアプラズマ・パルバム (U. parvum) 及びウレアプラズマ・ウレアリティカム (U. urealyticum) の迅速かつ簡便な検出法を提供する。

【解決手段】 試料から得られるDNAを鋳型とし、マイコプラズマ及びウレアプラズマのDNAをとともに高度に増幅できるプライマー対を用いてPCRを行うことにより増幅産物を得、増幅産物に対し、M. genitalium、M. hominis、U. parvum及びU. urealyticumに特異的な核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによりハイブリッドの形成を検出し、検出結果に基づいてマイコプラズマ及びウレアプラズマを検出する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行うことにより増幅産物を得、増幅産物に対し、核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによりハイブリッドの形成を検出し、検出結果に基づいてマイコプラズマ及びウレアプラズマを検出することを含む、マイコプラズマ及びウレアプラズマの検出方法であって、

PCRで用いられるプライマー対が、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む）の混合物であるプライマー対であり、ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブが、下記（a）～（d）から選ばれる1つ以上である、前記検出方法。

（a）配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む）。

（b）配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む）。

（c）配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む）。

（d）配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む）。

## 【請求項2】

プライマー対が、一方のプライマーが、配列番号5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、他方のプライマーが、配列番号6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物であるプライマー対である請求項1記載の検出方法。

## 【請求項3】

核酸プローブが、配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号10に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである請求項1又は2記載の検出方法。

## 【請求項4】

核酸プローブがマイクロタイタープレートのウェルに固定化されている請求項1～3のいずれか1項に記載の検出方法。

## 【請求項5】

請求項1に記載の検出方法に用いるためのキットであって、

PCRで用いられるプライマー対として、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む）の混合物であるプライマー対、ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブとして、下記（a）～（d）から選ば

れる1つ以上を含む、前記キット。

(a) 配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む)。

(b) 配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む)。

(c) 配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む)。

(d) 配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む)。

【請求項6】

プライマー対が、一方のプライマーが、配列番号5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、他方のプライマーが、配列番号6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物であるプライマー対である請求項5記載の検出方法。

【請求項7】

核酸プローブが、配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号10に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである請求項5又は6記載の検出方法。

【請求項8】

核酸プローブがマイクロタイタープレートのウェルに固定化されている請求項5～7のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PCR-ハイブリダイゼーションによるマイコプラズマおよびウレアプラズマの検出方法及びその方法のためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

マイコプラズマ・ジェニタリウム(M. genitalium)は、非淋菌性尿道炎(NGU)患者から初めて分離され、NGUの起炎菌の一つとして考えられたが、培養による検出が困難なため、その病原的意義は確立されていなかった。PCR法による検出が可能になると、M. genitaliumは、健康人に比べNGU患者から高い頻度で検出されることが分かった。霊長類への接種実験では、尿道炎様の症状が惹起され、また抗体価の上昇がみられた。これらの結果から、M. genitaliumはNGUの起炎菌であることが示唆されている。

【0003】

ウレアプラズマ・パルバム(U. parvum)及びウレアプラズマ・ウレアリティカム(U. urealyticum)は、1998年に分類法が改定されるまで、U. urealyticumの二つの生物型(biovar)とされていた。ウレアプラズマとNGUの関連を示唆する報告は多いが、一方でこれらは健康人からも高い頻度で検出されることが知られている。

【0004】

マイコプラズマ・ホミニス(M. hominis)は、細菌性膣症、骨盤内感染症、産褥熱など特に婦人科領域の感染症との関与が示唆されている。

【0005】

マイコプラズマ及びウレアプラズマの検出及び菌種同定に関しては、PCR法による16S rRNA遺伝子に基づくマイコプラズマ及びウレアプラズマの検出法、並びに、16S rRNA遺伝子の塩基配列の系統解析による菌種同定法が報告されている(特開2001-299352)。また、*M. genitalium*の検出に関しては、リアルタイムPCRによる定量が報告されている(*Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:1451-1455)。

#### 【0006】

系統解析による菌種同定法(特開2001-299352)は、マイコプラズマ及びウレアプラズマの同定に有用な方法である。しかしながら、塩基配列の読解を含むその操作工程は煩雑であり、時間もかかるため、多数の臨床検体を処理するには、なお改善の余地がある。

#### 【0007】

いくつかの細菌及びウイルスの検出に関しては、PCRによるDNA増幅と、マイクロタイタープレート上でのハイブリダイゼーションによる検出とを組み合わせた方法が知られているが、マイコプラズマ及びウレアプラズマに関しては、このような方法は知られていない。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

特開2001-299352に記載のマイコプラズマ及びウレアプラズマの検出法を用いて男子NGU患者等の尿を検査したところ、*M. genitalium*は、無症候性男子に比べ、NGU患者から高い頻度で検出された。また、無症候性男子の尿中に存在する*M. genitalium*の菌量は、*Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40:1451-1455に記載のリアルタイムPCRによる定量を行った結果、NGU患者のそれに比べ非常に少ないものであった。さらに、尿道炎の再発症例では、*M. genitalium*の菌量と臨床症状の相関する例が散見された。これらの結果は、*M. genitalium*がNGUの起炎菌に成り得ることを強く支持するものであった。さらに、尿道炎患者においては、*U. parvum*よりも*U. urealyticum*の検出頻度が高く、一方、健康人では*U. parvum*が優位であった。ウレアプラズマと尿道炎の関連は種別に検討する必要があると思われた。

#### 【0009】

本発明は、マイコプラズマ及びウレアプラズマのうち、特に迅速に検出することが有用と思われる*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*の迅速かつ簡便な検出法を提供することを課題とする。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*の検出を目的としたオリゴヌクレオチドプローブの設計に成功するとともに、マイコプラズマ及びウレアプラズマのDNAとともに高度に増幅できるプライマー対の設計に成功し、本発明を完成した。

#### 【0011】

従って、本発明は、以下のものを提供する。

(1) 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行うことにより増幅産物を得、増幅産物に対し、核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによりハイブリッドの形成を検出し、検出結果に基づいてマイコプラズマ及びウレアプラズマを検出することを含む、マイコプラズマ及びウレアプラズマの検出方法であって、

PCRで用いられるプライマー対が、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌ

クレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む）の混合物であるプライマー対であり、ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブが、下記（a）～（d）から選ばれる1つ以上である、前記検出方法。

【0012】

（a）配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む）。

（b）配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む）。

（c）配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む）。

（d）配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む）。

【0013】

（2）プライマー対が、一方のプライマーが、配列番号5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、他方のプライマーが、配列番号6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物であるプライマー対である（1）記載の検出方法。

【0014】

（3）核酸プローブが、配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号10に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号11に示すオリゴヌクレオチドである（1）又は（2）記載の検出方法。

【0015】

（4）核酸プローブがマイクロタイタープレートのウェルに固定化されている（1）～（3）のいずれか1項に記載の検出方法。

【0016】

（5）請求項1に記載の検出方法に用いるためのキットであって、PCRで用いられるプライマー対として、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む）の混合物であるプライマー対、ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブとして、下記（a）～（d）から選ばれる1つ以上を含む、前記キット。

【0017】

（a）配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む）。

（b）配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む）。

（c）配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設

定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む)。

(d) 配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む)。

【0018】

(6) プライマー対が、一方のプライマーが、配列番号5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、他方のプライマーが、配列番号6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物であるプライマー対である(5)記載の検出方法。

【0019】

(7) 核酸プローブが、配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、配列番号10に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号11に示すオリゴヌクレオチドである(5)又は(6)記載の検出方法。

【0020】

(8) 核酸プローブがマイクロタイタープレートのウェルに固定化されている(5)～(7)いずれか1項に記載のキット。

【0021】

なお、配列番号1に示す塩基配列は、*M. genitalis*標準株の16S rRNA遺伝子の塩基配列(GenBank accession No. X77334)であり、当業者であれば、16S rRNA遺伝子に変異を有する株であっても、株間等に存在し得る塩基配列の相違を考慮して、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号により特定された領域に相当する領域を容易に特定・認識することができる。

【0022】

また、配列番号2～4に示す塩基配列は、それぞれ、*M. hominis*、*U. parvum*(1998年の分類改定前は*U. urealyticum*)及び*U. urealyticum*の標準株の16S rRNA遺伝子の塩基配列(それぞれ、GenBank accession No. M24473, No. U06098及びNo. AF073450)であり、当業者であれば、16S rRNA遺伝子に変異を有する株であっても、株間等に存在し得る塩基配列の相違を考慮して、それぞれ、配列番号2、3及び4に示す塩基配列の塩基番号により特定された領域に相当する領域を容易に特定・認識することができる。

【0023】

【発明の実施の形態】

<1>本発明検出方法

本発明検出方法は、*M. genitalis*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*の1種以上を迅速かつ特異的に検出することを可能にする方法であり、試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行うことにより増幅産物を得、増幅産物に対し、核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによりハイブリッドの形成を検出し、検出結果に基づいてマイコプラズマ及びウレアプラズマを検出することを含む、マイコプラズマ及びウレアプラズマの検出方法であって、

PCRで用いられるプライマー対が、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む)の混合物であるプライマー対であり、

ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブが、下記(a)～(d)から選ばれる1つ以上であることを特徴とする。

【0024】

(a) 配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む)。

(b) 配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む)。

(c) 配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む)。

(d) 配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む)。

【0025】

試料は、*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*の1種以上を含むか又は含む可能性があるものであれば特に限定されないが、例としては、尿、尿道擦過物、子宮頸管擦過物などの尿路性器系材料を挙げることができる。これらの試料から、DNAの調製のための通常の方法によりDNAを得ることができる。

【0026】

本発明検出方法におけるPCRは、試料から得られるDNAを鋳型とし、特定のプライマー対を使用する他は、通常のPCRの方法に従って行うことができる。

【0027】

本発明において用いられるプライマー対は、プライマーの一方が、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む)の混合物である。配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドは、マイコプラズマに共通する塩基配列に基づいて設定されたプライマーであり、一方、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド(但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む)は、ウレアプラズマに共通する塩基配列に基づいて設定されたプライマーであるため、これらの混合物を用いることにより、*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*のいずれのDNAも同一条件で増幅でき、操作が簡便になる。

【0028】

プライマー対は、プライマー間の領域がPCRにより増幅されるように設定され、一方のプライマーがセンスプライマーであり、他方のプライマーがアンチセンスプライマーとなるように設定される。このようなプライマー対の例としては、一方のプライマーが、配列番号5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、他方のプライマーが、配列番号6に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び、配列番号7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの混合物であるプライマー対が挙げられる。

【0029】

混合物であるプライマーにおける2種のオリゴヌクレオチドの混合比率(モル比)は、通常には、*M. genitalium*及び*M. hominis*のDNAと、*U. parvum*及び*U. urealyticum*のDNAとがほぼ同等に増幅されるように選択される。



## 【0030】

本発明で用いられる(a)～(d)のプロープは、それぞれ、16S rRNA遺伝子においてM. genitalium、M. hominis、U. parvum及びU. urealyticumに特異的である塩基配列を有する。従って、検出対象の菌種にあわせて、選択すればよい。

## 【0031】

(a)～(d)のプロープは、それぞれ、配列番号1～4の特定の領域に相当する領域の塩基配列に基づいて(必要により、特定の塩基配列を有するように)設定される。ここで「配列番号1～4の特定の領域に相当する領域の塩基配列に基づいて」とは、配列番号1～4における特定の領域の塩基配列にかならずしも完全に重複している必要はなく、株間の塩基配列の相違や、ハイブリダイゼーションの特異性の向上のために、配列番号1～4における塩基配列と相違していてもよい。また、配列番号1～4の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプロープを設定することも含まれる。

## 【0032】

(a)～(d)のプロープの具体例としては、それぞれ、以下のものが挙げられる。

## 【0033】

- (a) 配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド
- (b) 配列番号9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド
- (c) 配列番号10に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド
- (d) 配列番号11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

## 【0034】

なお、配列番号9に示す塩基配列では、特異性を高めるために5'末端から3番目の塩基が改変(T→C)されている。また、配列番号10に示す塩基配列でも、特異性を高めるために、5'末端から4番目の塩基が改変(G→T)されている。

## 【0035】

上記の特定の領域におけるプロープ及びプライマー対の設定は、それぞれ、ハイブリダイゼーションおよびPCRに用いる条件を考慮して当業者に公知の方法に従って行えばよい。プロープ及びプライマー対の設定は、コンピューター検索に基づいて行うことでより効率的となる。

## 【0036】

プライマーは、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの一方又は両方について(オリゴヌクレオチドの混合物であるプライマーについてはそれらの一方又は両方について)、複数のプライマーを混合したミックスプライマーとして設定してもよい。プライマー設定部分に塩基の変異が存在する場合には、ミックスプライマーを用いることで検出効率を上げることができる。

## 【0037】

ハイブリダイゼーションの方法は、プロープが特異的にPCR産物にハイブリダイズする限り、特に限定されず、溶液ハイブリダイゼーション、フィルターハイブリダイゼーションなどの公知の方法を採用することができるが、プロープをマイクロタイタープレートのウェルに固定化して用いるマイクロタイタープレートハイブリダイゼーション法が、迅速に検出を行えるため、好ましい。ハイブリッドの形成の検出ための標識方法も、通常の方法を採用することができる。

## 【0038】

プロープを固定化する方法は、通常の核酸固定化方法に従って行うことができる。プロープを固定化するためのマイクロタイタープレートは市販品としても入手可能である。

## 【0039】

本発明検出方法によれば、検出感度が高く、培養を経ずに例えば尿等の臨床材料から直接にDNA増幅を行うことが可能であり、さらに、マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション法を利用した検出が可能であり、従って迅速な検出が可能となる。また、試料に複数の菌種が含まれている場合に、少量で含まれている菌種の検出も可能である。

## 【0040】

また、本発明の検出方法においては、PCRの反応液に、用いるプライマー対で増幅され得る内部標準物質（DNA）を添加し、内部標準物質に特異的なプローブを用いるハイブリダイゼーションを行うことにより、PCR反応の成否を把握することが可能である。内部標準物質は、検出対象であるマイコプラズマ及びウレアプラズマのDNAとPCR反応において競合する。従って、内部標準物質は、検出対象DNAの増幅を、ハイブリダイゼーションによる検出ができない程度にまで妨げないような量でPCR反応液に添加される。

## 【0041】

内部標準物質の例としては、*M. genitalium*の塩基配列の一部（配列番号1の塩基番号769～930）を、配列番号13に示す塩基配列で置換し、この置換領域を含む配列番号1の塩基番号293～1063に相当する領域をpT7Blue T-vector（Novagen, Inc.）に挿入して得られるプラスミドが挙げられる。また、この内部標準物質検出用プローブの例としては、配列番号12に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

## 【0042】

さらに、検出用プローブとして、16S rRNA遺伝子に共通する配列に基づいて設定されたプローブを追加してもよい。PCRでは、最終的な検出対象である4菌種以外のマイコプラズマDNAが増幅されることもあるが、このプローブを用いることにより、これが検出可能になる。

## 【0043】

このような16S rRNA遺伝子検出用プローブの例としては、配列番号14に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

## 【0044】

以下、図3を参照して説明する。図3は、測定結果の模式図及び判定例を示す。模式図に示すように、4種の菌種特異的プローブ（Mgen-P3-Am, Mhom-P10-Am, Upar-P6-Am, Uure-P4-Am）、内部標準物質検出用プローブ（IC-P4-Am）、及び、16S rRNA遺伝子検出用プローブ（Myc-P2-Am）がマイクロタイタープレートのウェルに固定化される。サンプル1～4には、内部標準物質（IC）が添加されている。

## 【0045】

サンプル1は、*M. genitalium*を含む試料の例であり、*M. genitalium*検出用プローブ（Mgen-P3-Am）が固定化されたウェルと、16S rRNA遺伝子検出用プローブ（Myc-P2-Am）が固定されたウェルとが陽性となる。ICは、*M. genitalium*のDNAとの競合により増幅される場合も増幅されない場合もあるため、IC検出用プローブ（IC-P4-Am）が固定化されたウェルは、陽性にも陰性にもなり得る（図では陰性の場合を示す）。

## 【0046】

サンプル2は、*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*を含めたマイコプラズマ及びウレアプラズマが含まれない試料の例であり、IC検出用プローブ（IC-P4-Am）を固定化したウェルが陽性となり、増幅反応が正常であることが確認できる。

## 【0047】

サンプル3は、4菌種以外のマイコプラズマを含む試料の例であり、16S rRNA遺伝子検出用プローブ（Myc-P2-Am）が固定されたウェルのみが陽性となる。サンプル1と同様の理由により、IC検出用プローブ（IC-P4-Am）が固定化されたウェルは、陽性にも陰性にもなり得る（図では陰性の場合を示す）。

## 【0048】

サンプル4は、増幅反応が不良である例であり、全てのウェルが陰性となる。この場合、増幅反応が正常でなかったために判定は不可能であることが分かる。

## 【0049】

## &lt;2&gt;本発明キット

本発明キットは、本発明検出方法に用いることのできるキットであり、PCRで用いられるプライマー対として、一方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号497～547に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、他方のプライマーが、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1012～1051に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド、及び、配列番号4に示す塩基配列の塩基番号963～1018に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号988～1003またはその一部を含む）の混合物であるプライマー対、ハイブリダイゼーションで用いられる核酸プローブとして、下記（a）～（d）から選ばれる1つ以上を含むことを特徴とする。

## 【0050】

（a）配列番号1に示す塩基配列の塩基番号806～855に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号826及び835の少なくとも一方を含む）。

（b）配列番号2に示す塩基配列の塩基番号618～660に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号638及び640の少なくとも一方を含む）。

（c）配列番号3に示す塩基配列の塩基番号787～834に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号807及び814の少なくとも一方を含む）。

（d）配列番号4に示す塩基配列の塩基番号783～830に相当する領域に基づいて設定された長さが15～30塩基のオリゴヌクレオチド（但し、塩基番号803及び810の少なくとも一方を含む）。

## 【0051】

プローブ及びプライマー対については、本発明検出方法に関し、上記に説明した通りである。

## 【0052】

プローブは、マイクロタイタープレートのウェルに固定化されていることが好ましい。ウェルへの固定化は上記に説明したように通常の方法によって行うことができる。

## 【0053】

本発明キットにおいてプライマー対は、混合物とされていてもよいし、別個に収容されていてもよい。

## 【0054】

本発明キットは、プローブ及びプライマー対の他に、PCR及び／またはハイブリダイゼーションを行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでいてもよい。

## 【0055】

## 【実施例】

次に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、下記実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、これによって本発明の範囲が何ら限定されるものではない。

## 【0056】

## 【実施例1】

## （1）試料及び核酸の抽出

ヒトからの分離が報告されているマイコプラズマ属13菌種（*M. buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. penetrans*, *M. pirum*, *M. pneumoniae*, *M. primatum*, *M. salivarium*, *M. spermatophilum*）

um)、およびウレアプラズマ属2菌種(U. parvum, U. urealyticum)を標準株として準備した。また、男性尿道炎患者及び無症候性男子から初尿を採取して臨床検体とした。

【0057】

尿からの核酸抽出は、文献(Journal of Clinical Microbiology, 2002. 40:105-110)に記載された方法に従って行った。標準株の培養菌液からの核酸抽出については、培養菌液に3分間の煮沸処理をして、遠心上清を抽出液とした。

【0058】

(2) PCR

(1)で得られた核酸溶液をテンプレート試料として、以下の条件でPCRを行った。

【0059】

1. プライマー

マイコプラズマおよびウレアプラズマの16S rRNA遺伝子の約520bpのフラグメントを増幅するため、以下の3つのプライマーを使用した。アンチセンスプライマーは、2つのプライマーの混合物(モル比で1:1)を使用した。

【0060】

センスプライマー

My-ins (5'-GTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATC-3'

(配列番号5))

アンチセンスプライマー(5'末端をビオチン(Biotin)で標識))

MGSO-2-Bi (5'-Biotin-CACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3' (配列番号6))

UGSO-Bi (5'-Biotin-CACCACCTGTCATATTGTTAACCTC-3' (配列番号7))

【0061】

2. 反応条件

上記プライマーを含む増幅反応液40μlに核酸溶液10μlを添加して、GeneAmp PCR System 9600(PERKIN ELMER)を使用し、以下の条件で行った。

95℃、10分+(94℃、30秒/55℃、30秒/72℃、1分)×50サイクル+72℃、7分

【0062】

この結果、15菌種の標準株から調製した核酸溶液の全てから、PCRによって増幅産物が得られた。

【0063】

(3) マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション

(2)で得られた各PCR産物を用いて、液相ハイブリダイゼーションをベースにした、マイクロタイタープレートアッセイを行った。マイクロタイタープレートの各ウェルには、以下に示した種特異オリゴヌクレオチドプローブを固定化した。

【0064】

M. genitalium検出用プローブ

Mgen-P3-Am (5'-TCGGAGCGATCCCTTCGGT-3' (配列番号8))

M. hominis検出用プローブ

Mhom-P-10-Am (5'-GACACTAGCAAAGTAGAGTTAG-3' (配列番号9))

U. parvum検出用プローブ

Upa-P6-Am (5'-GTCTGCCTGAATGGGTCGGT-3' (配列番号10))

U. *urealyticum*検出用プローブ

Uure-P4-Am (5' -GGCTCGAACGAGTCGGTGT-3' (配列番号11))

【0065】

固定化は、各プローブをC6リンカーを介して、5'末端をアミノ基で修飾し、マイクロタイタープレート (DNA-BIND 1x8 Stripwell plates、Corning) を用い、このプレートに付属のプロトコールに従って行った。

【0066】

ハイブリダイゼーションの詳細は以下の通りであった。各PCR産物を95℃で5分処理した後、水中にて急冷した。プローブを固定化したマイクロタイタープレートにハイブリダイゼーションバッファー (5x SSC, 0.02% SDS) を100μl/ウェル添加した後、熱変性PCR産物を5μlウェルに加えた。37℃で90分インキュベートした後、ウォッシュバッファーI (0.2x SSC, 0.1% SDS) でウェルを2回洗浄した。ストレプトアビジン-POD コンジュゲート溶液を100μl/ウェル添加し、37℃で15分インキュベートした。ウォッシュバッファーII (PBS中0.1% Tween) でウェルを2回洗浄した後、TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) 溶液100μl/ウェル添加し、暗所に10分静置した。希硫酸を100μl/ウェル加えた後、マイクロプレートリーダーでOD 450nmを測定した。カットオフ値は0.300とし、測定値が0.300以上の場合に陽性と判定し、0.300未満の場合は陰性と判定した。

【0067】

結果を図1に示す。図中、1~16は、1: *M. buccale*, 2: *M. faucium*, 3: *M. fermentans*, 4: *M. genitalium*, 5: *M. hominis*, 6: *M. lipophilum*, 7: *M. orale*, 8: *M. penetrans*, 9: *M. pirum*, 10: *M. pneumoniae*, 11: *M. primatum*, 12: *M. salivarium*, 13: *M. spermatophilum*, 14: *U. parvum*, 15: *U. urealyticum*, 16: ブランクを示す。図1から明らかなように、Mgen-P3-Am、Mhom-P10-Am、Up ar-P4-Am及びUure-P4-Amによれば、それぞれ検出対象菌種のDNAのみが検出され、それ以外のヒトマイコプラズマまたはウレアプラズマのDNAは検出されず (OD値がカットオフ値未満)、4種のプローブは交差反応しないことが判明した。

【0068】

(4) 検出感度

*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*の16S rRNA遺伝子の一部をそれぞれ挿入した組換えプラスミドを作製した。反応 (核酸溶液10μl) あたり $10^3 \sim 10^{-1}$ コピーとなるような量のプラスミドを含む溶液をテンプレート試料として、上記(2)及び(3)に従って、PCR-マイクロタイタープレートハイブリダイゼーションを行った。結果を図2に示す。図2中、1~6は、1:  $10^3$ コピー、2:  $10^2$ コピー、3:  $10^1$ コピー、4:  $10^0$ コピー、5:  $10^{-1}$ コピー、6: ブランクを示す。図2から明らかなように、本測定系は、 $10^1$ コピー/反応を下限に4菌種のDNAを検出可能であった。

【0069】

アンチセンスプライマーとしてMGSO-2-Biのみを用いた場合、*M. genitalium*及び*M. hominis*のDNAは、反応あたり10コピーまで検出可能であったが、*U. parvum*及び*U. urealyticum*のDNAは、100~1000コピー程度までしか検出できなかった。この原因は、MGSO-2-Biとウレアプラズマの塩基配列にミスマッチが多いためと思われる。上記のようにアンチセンスプライマーとして、MGSO-2-BiとUGSO-Biの混合物を用いることによって、*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. u*

*realyticum*の全てが、反応あたり10コピーまで検出可能になり、より多数の菌種を同時に高感度で同定することが可能になった。

【0070】

(5) 相関

上記(2)に従って得られた尿由来のPCR産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解読し、特開2001-299352に従って系統解析により菌種を同定した。この方法で*M. genitalium*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*と同定された試料のPCR産物に関し、上記(3)に従ってマイクロタイタープレートハイブリダイゼーションを行った。結果を表1に示す。表1から明らかなように、系統解析により同定された菌種が、上記ハイブリダイゼーションによっても検出された。さらに、いくつかの試料からは、上記ハイブリダイゼーションで複数の菌種が検出された。従って、上記ハイブリダイゼーションによる方法は、複数菌種のDNAが混在している場合、低比率で存在しているDNAを検出する能力がダイレクトシーケンス法を用いる方法よりも高いと推測される。

【0071】

【表1】

表1. 2法による検出結果の比較

系統解析		マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション	
検出菌種	陽性症例数	検出菌種	陽性症例数
<i>M. genitalium</i>	16	<i>M. genitalium</i>	13
		<i>M. genitalium</i> and <i>U. parvum</i>	3
<i>M. hominis</i>	16	<i>M. hominis</i>	5
		<i>M. hominis</i> and <i>U. parvum</i>	9
		<i>M. hominis</i> and <i>U. urealyticum</i>	2
<i>U. parvum</i>	29	<i>U. parvum</i>	29
<i>U. urealyticum</i>	18	<i>U. urealyticum</i>	17
		<i>U. urealyticum</i> and <i>U. parvum</i>	1

【0072】

上記推測を確かめるため、上記(4)で作製した組換えプラスミドを、下記の比率(モル比)で混合し、混合したプラスミド(総DNA量は、反応あたり $10^5$ コピー)をテンプレートにして、上記(2)及び(3)に従いPCR-マイクロタイタープレートハイブリダイゼーションを行った。

【0073】

組み合わせ：*M. genitalium*/*U. urealyticum*、*M. hominis*/*U. parvum*

混合比率：100:0, 99:1, 95:5, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 5:95, 1:99, 0:100

【0074】

結果を表2及び表3に示す。これらの表から明らかなように、上記PCR-マイクロタイタープレートハイブリダイゼーションは、1%の低比率で混在しているDNAを検出可能であり、上記推測が支持された。

【0075】

【表2】

表2. DNA混合サンプル(*M. genitalium* /*U. urealyticum* )の検出

DNA混合比率 M. gen/U. ure	Mgen-P3-Am OD 450 nm	Uure-P4-Am OD 450 nm
100:0	0.1371	0.145
99:1	0.1359	0.145
95:5	0.1367	0.145
90:10	0.1371	0.145
70:30	0.1371	0.145
50:50	0.1371	0.145
30:70	0.1371	0.145
10:90	0.1371	0.145
5:95	0.1371	0.145
1:99	0.1371	0.145
0:100	0.124	0.145


 は陽性判定

【0076】

【表3】

表3. DNA混合サンプル(*M. hominis* /*U. parvum* )の検出

DNA混合比率 M. hom/U. par	Mhom-P10-Am OD 450 nm	Upar-P6-Am OD 450 nm
100:0	0.089	0.089
99:1	0.089	0.089
95:5	0.089	0.089
90:10	0.089	0.089
70:30	0.089	0.089
50:50	0.089	0.089
30:70	0.089	0.089
10:90	0.089	0.089
5:95	0.089	0.089
1:99	0.089	0.089
0:100	0.084	0.089

 は陽性判定

【0077】

【発明の効果】

本発明によれば、臨床サンプル中の*M. genitalum*、*M. hominis*、*U. parvum*及び*U. urealyticum*を迅速に、かつ高感度で検出することが可能である。性感染症をはじめとした、尿路泌尿器系の疾患の検査等において、本発明の方法は極めて有用である。

【0078】

## 【配列表】

〈110〉 株式会社三菱化学ビーシーエル(Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.)

〈120〉 マイコプラズマおよびウレアプラズマの検出方法

〈130〉 P-B0032

〈160〉 14

〈210〉 1

〈211〉 1490

〈212〉 DNA

〈213〉 *Mycoplasma genitalium*

〈400〉 1

agagtttgat cctggctcag gattaacgct ggcggcattg ctaatacatg caagtcgatc	60
ggaagtagca atactttaga ggccaacggg tgagtaacac gtatccaatc taccttataa	120
tgggggataa ctagttgaaa aactagctaa taccgcataa gaactttagt tcgcatgaat	180
taaagttgaa aggacctgca agggttcgtt atttgatgag ggtagcgcct atcagctagt	240
tggtagggta atggcctacc aaggcaatga cggttagcta tgcctgagaag tagaatagcc	300
acaatgggac tgagacacgg ccctactcc tacgggaggc agcagtaggg aattttcac	360
aatgagcgaa agcttgatgg agcaatgccg cgtgaacgat gaaggcttt ttgattgtaa	420
agttctttta ttgggaaga atgactctag caggcaatgg ctggagttag actgtaccac	480
tttgaataag tgacgactaa ctatgtgcca gcagtcgcgg taatacatag gtcgcaagcg	540
ttatccggat ttattgggcg taaagcaagc gcaggcggat tgaaaagict ggtgttaaag	600
gcagctgctt aacagttgta tgcattggaa actatcagtc tagagtgtgg tagggagttt	660
tggaaattca tgtggagcgg tgaaatgcgt agatataatga aggaacacca gtggcgaagg	720
cgaaaactta ggccattact gacgcttagg cttagaaagt tggggagcaa ataggattag	780
ataccctagt agtccacacc gtaaagata gatactagct gtcggagcga tcccttcggt	840



agtgaagta acacattaa tatctgcct gggtagtaca ttcgaagaa tgaaactcaa	900
acggaatiga cggggaccg cacaagiggt ggagcatgtt gcttaaticg acggtacacg	960
aaaaaccita cctagacttg acatccitgg caaagttaat gaaacataat ggaggttaac	1020
cgagigacag gtggigcatg gtgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggtaaagtc	1080
cgcaacgagc gcaaccctta tcgttagtta catlgtttaa cgagactgct aatgtaaatt	1140
ggaggaagga agggatgacg tcaaatcatt atgcccctta tgtctagggc tgcaaactg	1200
ctacaatggc caatacaaac agtagccaac ttgtaaaagt gagcaaatct gaaaagttag	1260
tctcagttcg gatigagggc tgcaaticgt cctcatgaag ctggaatcac tagtaatcgc	1320
gaatcagcta tgcgcgggtg aatacgttct cgggicttgt acacaccgcc cgtaaaccta	1380
tgaagctgg taatatitaa aaacgtgttg ctaaccttta ttggaagcgc atgicaggga	1440
tagcaccgtt gatitggagt aagtcgtaac aaggtacccc tacgagaacg	1490

<210> 2

<211> 1468

<212> DNA

<213> *Mycoplasma hominis*

<220>

<221> Unsure

<222> 1, 108, 198, 213, 329, 330, 431, 520, 521, 552, 575, 581..583, 880, 904..951, 1100, 1104, 1429..1431, 1464, 1465

<400> 2

ntttttataa gagttigatc ctggctcagg atgaacgctg gctgtgtgcc taatacatgc	60
atgtcgagcg aggttagcaa taactagcgg cgaatgggtg agtaactngt gcttaatcta	120
ccitttagat tggaaatacc attggaaaca atggctaatt ccggatacgc atggaaccgc	180
atggttcgt tgtgaaangc gctgttaaggc gcnactaaaa gatgaggggt cggaacatta	240
gttagtttgt gaggtaatgg cccaccaaga ctatgatgtt tagccgggtc gagagactga	300
acggccacat tggactgag atacggccnn aactcctacg ggaggcagca gtagggaata	360

ttccacaatg agcgaaagct tgatggagcg acacagcgtg cacgatgaag gtcctcggat	420
tgtaaagtc ngttataagg gaagaacatt tgcaatagga aatgattgca gactgacggt	480
acctgtcag aaagcgatgg ctaactatgt gccagcagcn ncggtaatac ataggtcgca	540
agcgtaatcc gnaattattg ggcgtaaagc gticntaggc nnnitgttaa gtcaggagt	600
aaatcccggg gctcaacccc ggctcgcttt ggatactagc aaactagagt tagatagagg	660
taagcggaat tccatgigaa gcggigaaat gcgtagatai atggaagaac accaaaaggcg	720
aaggcagcct actgggicta tactgacgct gaggagcgaa agcgaggga gcaaacagga	780
ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgatcatt agtcgggtga gaatcactga	840
cgcagctaac gcattaaatg atccgcciga gtagiatgcn cgcaagagt aaacttaaag	900
gaannnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntacacggaa	960
aacctiacc actctigaca tccttcgcaa agctatagag atatagtga ggttatcgga	1020
gtgacagatg gtgcatggti gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgtttggt caagtcctgc	1080
aacgagcgca acccctatcn ttanttacta acatlaagti gagcactcta gagatactgc	1140
ctgggtiaact gggagggaagg tggggaigac gtcaaatcat catgcctctt acgagtgagg	1200
ccacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa gagaagcaat atggcgacat ggagcaaate	1260
tcaaaaagcc gatctcagti cggattggag tcigcaattc gactccaiga agtcggaate	1320
gctagtaate gcagatcagc tatgtcgcgg tgaatacgti ctgggtctt gtacacaccg	1380
cccgtcacac catgggagct ggtaataccc aaagtcggti tgctaaccnn ncggaggcga	1440
ccgcciaagg taggactggt gacnnggg	1468

(210) 3

(211) 1439

(212) DNA

(213) *Ureaplasma urealyticum*

(400) 3

attaacgctg gcggcatgcc taatacatgc aaatcgaacg aagccittta ggcitagtgg	60
tgaacgggtg agtaacacgt atccaatcta cccitiaagti ggggataact agtcgaaaga	120
ttagcttaata ccgaataata acatcaatat cgcatgagaa gatgtagaaa gtgcctcttt	180

gtggcgacgc ttttggatga ggggtgcgacg tatcagatag ttggtagagt aatggctcac	240
caagicaatg acgcgtagct gtactgagag gtagaacagc cacaatggga ctgagacacg	300
gcccatactc ctacgggagg cagcagiagg gaatitttca caatgggcgc aagccittatg	360
aagcaatgcc gcgtgaacga tgaaggcttt atagattgta aagtictitt atatgggaag	420
aaacgctaag ataggaaatg attttagttt gacigtacca ttgaataag tatcggttaa	480
ctatgtgcca gcagccgcgg taatacatag gatgcaagcg ttatccgat ttactggcg	540
taaaacgagc gcaggcgggc ttgtaagttt ggtattaaat ctatgtctt aacgtctagc	600
tgtatcaaaa actgtaaacc tagagtgtag tagggagtgt gggaaactcca tgtggagcgg	660
taaaatgcgt agatataatg aagaacaccg gtggcgaaag cgccaacttg gactatcact	720
gacgttagg ctcgaaagtgt tggggagcaa ataggattag ataccctagt agtccacacc	780
gtaaacgata atcattaaat gtcggccatg atgggtcgtt gtgttagcta acgcattaaa	840
tgtgtgcctt gggtagtaca ttgcgaagaa tgaacticaa acggaatiga cggggacccg	900
cacaagtggt ggagcatgtt gcttaatttg acaatacacg tagaaccita cctaggtttg	960
acatctattg cgtatctata gaaatatagt tgaggttaac aatatgacag gtgggtgatg	1020
gtgtgtgca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccctt	1080
tcgttagita cttttctagc gatactgcta ccgcaaggta gaggaagggt gggatgacgt	1140
caaatcatca tgcaccttat atctagggtt gcaaacgtgc tacaatggct aatacaaact	1200
gctgcaaaat cgtaagatga agcgaaacag aaaaagttag tctcagttcg gatagagggc	1260
tgcaattcgt cctcttgaag ttggaatcac tagtaatcgc gaatcagaca tgtcgcgggtg	1320
aatacgttct cgggtcttgt acacaccgcc cgtaaaacta tgggagctgg taatatctaa	1380
aaccgcaaag ctaacccttt ggaggcatgc gtctagggtt ggaatcggta ctggagtta	1439

(210) 4

(211) 1435

(212) DNA

(213) *Ureaplasma urealyticum*

(400) 4

attaacgctg gcggcatgcc taatacatgc aaatcgaacg aagcccttita ggcttagtgg	60
--	----

igaacgggig agtaacacgt atccaaccta cccttaagti ggggataact agtcgaaaga	120
itagctaata ccgaataata acatcaatat cgcatgagaa gatgtagaaa gtcgcgtttg	180
cgacgccttt ggatgggggt gcgacgiatc agatagtigg igaggtaatg gctcaccaag	240
tcaatgacgc gtagctgtac tgagaggtag aacagccaca atgggactga gacacggccc	300
atactcctac gggaggcagc agtagggaat ttctcacaat gggcgcaagc ctatgaagc	360
aatgccgcgt gaacgatgaa ggtcttatag attgtaaagt tcttttatat gggagaagaa	420
gctaagatag gaaatgattt tagtttgact gtaccatttg aataagtaic ggctaaactat	480
gtgccagcag ccgcggtaat acataggatg caagcggttat ccggatttac tgggcgtaaa	540
acgagcgcag gcgggtttgt aagtttggta ttaaacttag atgcttaacg tctagctgta	600
tcaaaaactg taaacctaga gtgtagttag gagttgggga actccatgtg gagcggtaaa	660
atgcgtagat atatggaaga acaccggigg cgaaggcgcc aacttggact atcacigacg	720
cttaggcicg aaagtgtggg gagcaaatag gattagatac cctagtagtc cacaccgtaa	780
acgatcatca ttaaatgtcg gctcgaacga gtccggigtg tagctaacgc attaaatgat	840
gtgccitgggt agtacattcg caagaatgaa actcaaacgg aattgacggg gacccgcaca	900
agtggtggag catgttgctt aatttgacaa tacacgtaga accttaccta ggtttgacat	960
ctattgcgac gctatagaaa tatagttag gttacaata tgacaggigg tgcattggtg	1020
tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcgccga acgagcgcaa cccctttcgt	1080
tagttgcttt tctagcgata ctgctaccgc aaggtagagg aaggtagggga tgacgtcaaa	1140
tcatcaigcc ccttatatct agggctgcaa acgtgctaca atggctaata caaacgtctg	1200
caaaatcgta agatgaagcg aaacagaaaa agttagctc agttcggata gagggctgca	1260
attcgccctc ttgaagtigg aatcactagt aatcggaat cagacatgtc gcggtgaata	1320
cgttctcggg tcttgtacac accgccgctc aaactatggg agctggtaat atctaaaacc	1380
gcaaagctaa ccttttggag gcatgcgctt aggttaggat cggtagctgg agtta	1435

(210) 5

(211) 26

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

gtaatacata ggicgcaagc gttatc

26

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

caccatcigt cactctgtta acctc

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

caccaccigt catatigtta acctc

25

<210> 8

<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 8  
tcggagcgat cccttcggt

19

<210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 9  
gacactagca aactagagtt ag

22

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> probe

<400> 10

gictgcctga atgggtcgg

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 11

ggctcgaacg agtcggigt

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

ctagctgtcg gctggaattc

20

<210> 13

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

cctagtagcc tagtgcaaat agagtcacac ccgtaaacga tagatactag ctgtcggctg	60
gaattccgat cctgcaggta	80

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 14

tgggagcaa ataggattag atacccctggt agtcc	35
--	----

【図面の簡単な説明】

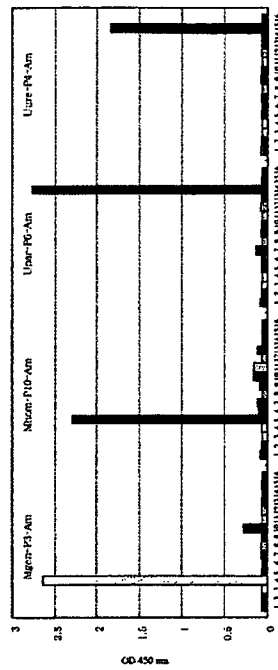
【図1】各オリゴヌクレオチドプローブの特異性を検討した結果を示す。

【図2】検出感度を検討した結果を示す。

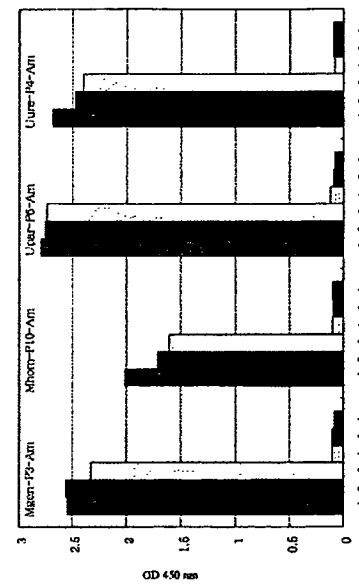
【図3】測定結果の模式図及び判定例を示す。



【図1】

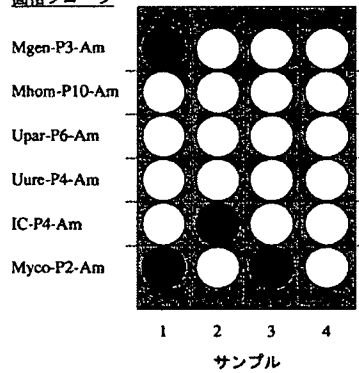


【図2】



【図3】

## 固相プローブ



## 判定

サンプル1: *M. genitalium*陽性

サンプル2: 4菌種とも検出せず (増幅反応は正常)

サンプル3: 4菌種以外のマイコプラズマ陽性

サンプル4: 増幅反応不良

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/569

F I

G 0 1 N 33/569

F

テーマコード (参考)

Fターム(参考) 4B024 AA13 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA13 HA14  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ50 QR08 QR32 QR35 QR39  
QR42 QR55 QR62 QR82 QS25 QS34 QS35 QX02